

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-008684

(43)Date of publication of application : 16.01.2001

(51)Int.Cl. C12N 15/09
 C12Q 1/68
 //(C12N 15/09
 C12R 1:85)
 (C12Q 1/68
 C12R 1:85)

(21)Application number : 11-179308

(71)Applicant : ASAHI BREWERIES LTD

(22)Date of filing : 25.06.1999

(72)Inventor : YAMAGISHI HIROMI
 OGATA TOMOO

(54) NEW OLIGONUCLEOTIDE AND METHOD FOR DIFFERENTIATING YEASTS

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new base sequence which contains a specific base sequence, is in a spacer region between the gene coding for 26S rRNA and the gene coding for 5S rRNA of bottom fermenting beer yeast BF1, and is useful for differentiating and/or identifying beer yeasts and so on.

SOLUTION: This is a new base sequence which contains at least a part of the base sequence shown by the formula, is in a spacer region between the gene coding for 26S rRNA and the gene coding for 5S rRNA of bottom fermenting beer yeast BF1, and is useful for more in detail differentiating and/or identifying beer yeasts as a primer for the PCR method and for the production and/or quality control of beer and so on.

Cleavage patterns of a PCR product of a spacer region between the gene coding for 26S rRNA and the gene coding for 5S rRNA by a restriction enzyme are different between bottom fermenting beer yeasts *Saccharomyces bayanus* and *S. cerevisiae*, so that the gene sequence allows differentiating bottom fermenting beer yeasts.

1. A new oligonucleotide having a base sequence represented by the formula (1) or (2), which is located in a spacer region between the gene coding for 26S rRNA and the gene coding for 5S rRNA of bottom fermenting beer yeast BF1, and is useful for differentiating and/or identifying beer yeasts and so on.

2. A method for differentiating and/or identifying beer yeasts, comprising the steps of: (a) amplifying a spacer region between the gene coding for 26S rRNA and the gene coding for 5S rRNA of bottom fermenting beer yeast BF1 by a PCR method using the oligonucleotide of claim 1 as a primer; and (b) analyzing the amplified product by a restriction enzyme.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 04.06.2002

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-8684

(P2001-8684A)

(43) 公開日 平成13年1月16日 (2001.1.16)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 6 3
// (C 1 2 N 15/09	Z N A		
C 1 2 R 1:85)			
(C 1 2 Q 1/68			

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 11 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平11-179308

(22) 出願日 平成11年6月25日 (1999.6.25)

(71) 出願人 000000055

アサヒビール株式会社

東京都中央区京橋3丁目7番1号

(72) 発明者 山岸 裕美

茨城県北相馬郡守谷町緑1-1-21 アサ

ヒビール株式会社酒類研究所内

(72) 発明者 尾形 智夫

東京都大田区大森北2-13-1 アサヒビ

ール株式会社東京工場内

(74) 代理人 100083714

弁理士 舟橋 榮子

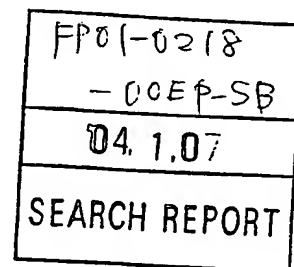
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規オリゴヌクレオチドとそれを用いた酵母分類法

(57) 【要約】

【課題】本発明は、下面発酵ビール酵母を分類するのに利用可能なオリゴヌクレオチド及びそれを利用した下面発酵ビール酵母の分類方法を提供する。

【解決手段】下面発酵ビール酵母及びサッカロマイセス・バヤナス (*Saccharomyces bayanus*) の26 S r R N A をコードする遺伝子と5 S r R N A をコードする遺伝子との間のスベーター領域の遺伝子を明らかにし、この遺伝子配列の全部または一部を用いて、下面発酵ビール酵母を分類した。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1に示される塩基配列の一部または全部を含む下面発酵ビール酵母BFD1の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスぺーサー領域の遺伝子配列。

【請求項2】 配列番号2に示される塩基配列の一部または全部を含む下面発酵ビール酵母1DO2003の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスぺーサー領域の遺伝子配列。

【請求項3】 配列番号3に示される塩基配列の一部または全部を含む下面発酵ビール酵母CBS1513の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスぺーサー領域の遺伝子配列。

【請求項4】 配列番号4に示される塩基配列の一部または全部を含むサッカロマイセス・パストリアヌス(*Saccharomyces pastorianus*) タイプストレインCBS1538の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスぺーサー領域の遺伝子配列。

【請求項5】 配列番号5に示される塩基配列の一部または全部を含むサッカロマイセス・バヤナス(*Saccharomyces bayanus*) タイプストレインCBS380の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスぺーサー領域の遺伝子配列。

【請求項6】 下面発酵ビール酵母の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスぺーサー領域の遺伝子配列が以下の配列、

5'-TATATCTATTATAATATACGATGAGGATGA-3' ①

を有するか、または対応する相補的配列を有することを特徴とするオリゴヌクレオチド。

【請求項7】 下面発酵ビール酵母の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスぺーサー領域の遺伝子配列が以下の配列、

5'-GGTAGTGGTAGTATGTAACAGCTTGAGAGA-3' ②

を有するか、または対応する相補的配列を有することを特徴とするオリゴヌクレオチド。

【請求項8】 請求項1から5に記載された遺伝子配列より作成したオリゴヌクレオチドあるいは請求項6あるいは7に記載されたオリゴヌクレオチドと26SrRNAより作成したオリゴヌクレオチドを、核酸合成のプライマーとして機能させ、遺伝子増幅処理することによって酵母を分類する方法。

【請求項9】 請求項8記載の遺伝子増幅処理により得られた遺伝子増幅産物をプローブとして作用させ、サザンハイブリダイゼーションを行い、酵母を分類する方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、酵母を分類するのに利

用可能な遺伝子及びそれを利用した酵母の分類方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 近年、酵母の染色体構造の解析と酵母の分類法について各種の報告がある。例えば、J GEN APPL MICROBIOL, VOL. 41, NO. 3, 239-247, 1995には、サッカロマイセス・バヤナス(*Saccharomyces bayanus*)、サッカロマイセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)、下面発酵ビール酵母について電気泳動的核型を検討し、その結果から下面発酵ビール酵母がサッカロマイセス・バヤナス(*Saccharomyces bayanus*)とサッカロマイセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)との交雑体であることが記載されている。また、日本農芸化学1998年大会要旨集13ページ、2A7p24には、パルスフィールドゲル電気泳動とサザンハイブリダイゼーションにより下面発酵ビール酵母の染色体構造を検討した結果、下面発酵ビール酵母はサッカロマイセス・バヤナス(*Saccharomyces bayanus*)とサッカロマイセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)との交雑体であることが報告されている。一方、FEMS MICROBIOLOGY LETTERS 108, 259-264, 1993には、サッカロマイセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)、サッカロマイセス・カールスベルゲンシス(*Saccharomyces carlsbergensis*)、サッカロマイセス・パストリアヌス(*Saccharomyces pastorianus*)の3種の酵母について、26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスぺーサー領域のPCR産物の制限酵素断片長を比較している。さらに、本発明者らは、特開平11-56366「酵母を同定する方法」にて、rDNAの一部のPCR産物及び制限酵素断片長多型性とを組み合わせたビール醸造用酵母と非醸造用酵母を分類同定する方法を開示している。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 これらの従来技術をもとに、検討する酵母がサッカロマイセス(*Saccharomyces*)属のどの種に該当するのか確認したり、ビール醸造用酵母と非醸造用酵母の分類を行うことは可能である。しかしながら、今日では、さらにビール醸造用の下面発酵ビール酵母においても、できるだけ個々の酵母に対する細やかな分類が望まれており、その課題については従来の報告内容ではその要望は達成が困難である。そこで、本発明では、下面発酵ビール酵母におけるより詳細な分類・同定に利用できる方法を提供することを目的とする。

【0004】

【課題を解決するための手段】 上記の課題を解決するために、鋭意研究を行った結果、下面発酵ビール酵母各株の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスぺーサー領域を含むDNAの塩基配列を決定し、この塩基配列よりプライマーを作

製し、当該DNAをPCR（ポリメラーゼ・チェーン・リアクション）法にて増幅し、その増幅産物を比較することにより、下面発酵ビール酵母を分類・同定できることを見だし、本発明を完成させた。

【0005】従って、(1)第1の発明は、配列番号1に示される塩基配列の一部または全部を含む下面発酵ビール酵母BF1の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスペーサー領域の遺伝子配列である。(2)第2の発明は、配列番号2に示される塩基配列の一部または全部を含む下面発酵ビール酵母IFO2003の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスペーサー領域の遺伝子配列である。

(3)第3の発明は、配列番号3に示される塩基配列の一部または全部を含む下面発酵ビール酵母CBS1513の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスペーサー領域の遺伝子配列である。

(4)第4の発明は、配列番号4に示される塩基配列の一部または全部を含むサッカロマイセス・パストリアヌス(*Saccharomyces pastorianus*)タイプストレインCBS1538の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスペーサー領域の遺伝子配列である。

(5)第5の発明は、配列番号5に示される塩基配列の一部または全部を含むサッカロマイセス・バヤナス(*Saccharomyces bayanus*)タイプストレインCBS380の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスペーサー領域の遺伝子配列である。

(6)第6の発明は、下面発酵ビール酵母の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスペーサー領域の遺伝子配列が以下の配列、

5'-TATATCTATTATAATATACGATGAGGATGA-3' ①

を有するか、または対応する相補的配列を有することを特徴とするオリゴヌクレオチドである。

(7)第7の発明は、下面発酵ビール酵母の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスペーサー領域の遺伝子配列が以下の配列、

5'-GGTAGTGGTAGTATGTAACAGCTTGAGAGA-3' ②

を有するか、または対応する相補的配列を有することを特徴とするオリゴヌクレオチドである。

(8)第8の発明は、上記(1)から(5)に記載された遺伝子配列より作成したオリゴヌクレオチドあるいは上記(6)及び(7)に記載されたオリゴヌクレオチドと26SrRNAより作成したオリゴヌクレオチドを、

核酸合成のプライマーとして機能させ、遺伝子増幅処理することによって下面発酵ビール酵母を分類する方法である。

(9)第9の発明は、上記第8の発明において得られる遺伝子増幅産物をプローブとして作用させ、サザンハイブリダイゼーションを行い、酵母を分類する方法である。

【0006】本発明で実施する遺伝子増幅に関する技術は既に公知である。本技術は、特定の遺伝子配列を増幅させる反応であり、迅速・高感度で高い特異性を持ちかつ簡便であることから現在広い分野で利用されている。本発明においても、Saikiらが開発したPolymerase Chain Reaction法(以下、PCR法と略す; Science 230.135 0.1985)を参考にして実施することができる。

【0007】

【発明の実施の形態】本発明の概要を説明する。

(1)まず、下面発酵ビール酵母、サッカロマイセス・バヤナス(*Saccharomyces bayanus*)、サッカロマイセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスペーサー領域のPCR産物について制限酵素で切断し、得られた制限酵素切断パターンを比較する。制限酵素には、MspI、SrfIIを利用できる。MspIとSrfIIを制限酵素として利用した場合、その切断パターンから下面発酵ビール酵母は2タイプに分類される。

(2)次に、下面発酵ビール酵母、サッカロマイセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)、サッカロマイセス・バヤナス(*Saccharomyces bayanus*)の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスペーサー領域の塩基配列を決定する。塩基配列の決定方法は、公知の4000L Long ReadIR(登録商標)DNA Sequencing System(LI-COR社製)の方法を利用することができる。得られた塩基配列の相同性を比較検討し、異なる塩基配列部分を確認する。サッカロマイセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)及びサッカロマイセス・バヤナス(*Saccharomyces bayanus*)との相同性を検討すると、下面発酵ビール酵母は2タイプに分類される。配列の違う部分は、配列番号1の101番目から1157番目、配列番号2の101番目から1154番目、配列番号3の101番目から1112番目、配列番号4の101番目から1113番目、配列番号5の101番目から1112番目である。

【0008】(3)(2)で決定した配列のうち、同じタイプの下面発酵ビール酵母にのみPCR増幅産物が得られるようなプライマーを設計し、合成する。合成方法は既知の方法で実施できる。プライマーとなる塩基配列は、配列番号6及び7に示したものは一例であり、これに限定されるものではない。

(4)同じタイプの下面発酵ビール酵母にのみPCR増幅産物が得られるようなプライマーとそれらプライマー

に組み合わせて共通して使用するプライマーを用いた。組み合わせて共通して使用するプライマー③のオリゴヌクレオチド配列を配列番号8に示す。但し、このプライマーはこのものに限定されるものではなく、26S rRNAをコードする塩基配列のものであればかまわない。これらプライマーを用いて、検討する下面発酵ビール酵母の遺伝子をPCR法で増幅させ、どちらの分類に属するかを決定する。(1)の方法はrDNAスベーター領域の一部をPCRにより増幅させ、その増幅産物を制限酵素で切断してハターンを比較する方法で、下面発酵ビール酵母を分類することができるが2段階の試験を必要とする。しかし、本方法はrDNAスベーター領域の下面発酵ビール酵母間で確実に差異のある部分をPCR法で増幅させて増幅の有無により分類するという簡単で確実な方法である。また、実施例以外のビール酵母にも十分応用可能な方法と考えられる。

(5) (4)の分類方法とは別の方法として、サザンハイブリダイゼーションによる分類方法がある。すなわち、(4)で増幅した産物をプローブとして、下面発酵ビール酵母のDNAに作用させてサザンハイブリダイゼーションを行い、どちらの分類に属するかを決定する。

【0009】本発明の配列表について説明する。配列番号1は、配列の長さが1432、配列の型が核酸、鎖の数が2本鎖、トポロジーが直鎖状、配列の種類がgenomic DNA。起源が下面発酵ビール酵母BF1の配列である。配列番号2は、配列の長さが1429、配列の型が核酸、鎖の数が2本鎖、トポロジーが直鎖状、配列の種類がgenomic DNA。起源が下面発酵ビール酵母IFO2003の配列である。

【0010】配列番号3は、配列の長さが1386、配列の型が核酸、鎖の数が2本鎖、トポロジーが直鎖状、配列の種類がgenomic DNA。起源が下面発酵ビール酵母CBS1513の配列である。配列番号4は、配列の長さが1387、配列の型が核酸、鎖の数が2本鎖、トポロジーが直鎖状、配列の種類がgenomic DNA。起源がサッカロマイセス・パストリアヌス(*Saccharomyces pastorianus*)タイプ・ストレインCBS1538の配列である。配列番号5は、配列の長さが1386、配列の型が核酸、鎖の数が2本鎖、トポロジーが直鎖状、配列の種類がgenomic DNA。起源がサッカロマイセス・バヤナス(*Saccharomyces bayanus*)CBS380の配列である。

【0011】配列番号6は、配列の長さが30、配列の型が核酸、鎖の数が2本鎖、トポロジーが直鎖状、配列の種類がgenomic DNA。起源が下面発酵ビール酵母IFO2003の配列である。配列番号7は、配列の長さが30、配列の型が核酸、鎖の数が2本鎖、トポロジーが直鎖状、配列の種類がgenomic DNA。起源が下面発酵ビール酵母CBS1513の配列である。

【0012】

【実施例】以下に、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されない。実施例1

下面発酵ビール酵母のrDNAスベーター領域のPCR産物の制限酵素切断パターンの比較

下面発酵ビール酵母BF1、下面発酵ビール酵母BF2、下面発酵ビール酵母CBS1513、下面発酵ビール酵母IFO2003、サッカロマイセス・パストリアヌス(*Saccharomyces pastorianus*)タイプ・ストレインCBS1538下面発酵ビール酵母ATCC10596、下面発酵ビール酵母NCYC529、下面発酵ビール酵母NCYC1047、下面発酵ビール酵母IFO10012、サッカロマイセス・バヤナス(*Saccharomyces bayanus*)CBS380、及びサッカロマイセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)X2180-1Aを試験に用いた。

【0013】上記酵母を適当な増殖用培地にて培養を行った後、菌体を遠心操作により回収した。その後、菌体からのDNA抽出は、Hoffman and Winstonの方法(Gene 57267-272(1987))に従って行った。このDNA溶液1-50ng/ μ lを鋳型に、TakaraExTaq(登録商標、宝酒造)を用いてプロトコール通りに反応溶液を調整した。プライマーの合成は、先行文献[FEMSマイクロバイオリソロジー・レター(FEMS Microbiology Letters)]に記載のプライマー配列を用いて、サワディーテクノロジー(株)に委託した。PCRは、アステック社のPROGRAM TEMP CONTROL SYSTEM PC-800を用い、増幅反応を行った。反応条件は、94℃5分間の変性後、94℃、2分30秒間の変性→55℃1分30秒間のプライマーのアニーリング→72℃、3分間の合成反応のサイクルを25サイクル行った。反応後、5 μ lの反応液をとり、アガロースゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイドでDNAを染色して、増幅されたDNAを確認した。その後、この増幅産物の一部を取り、制限酵素MspI(TAKARA)またはSceFI(東洋紡社)により、37℃、60分間反応させた後、アガロースゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイドでDNAを染色して、制限酵素切断パターンを比較した。

【0014】その結果を図1に示した。図1からも明らかなように、下面発酵ビール酵母は、2つのタイプに分類されることの確認された。グループ1には、下面発酵ビール酵母BF1、下面発酵ビール酵母BF2、下面発酵ビール酵母CBS1513、下面発酵ビール酵母IFO2003、下面発酵ビール酵母ATCC10596、下面発酵ビール酵母NCYC529、下面発酵ビール酵母NCYC1047、下面発酵ビール酵母IFO10012が属し、グループ2には、下面発酵ビール酵母CBS1513、サッカロマイセス・パストリアヌス(*Saccharomyces pastorianus*)タイプ・ストレインCBS1538が属していた。

【0015】実施例2

下面発酵ビール酵母の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスぺーサー領域のクローニング及び塩基配列の決定

下面発酵ビール酵母BF1、下面発酵ビール酵母IFO2003、下面発酵ビール酵母CBS1513、サッカロマイセス・バストリアヌス (*Saccharomyces pastorianus*) タイプ・ストレインCBS1538の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスぺーサー領域の塩基配列を決定した。

【0016】上記酵母を適当な増殖用培地にて培養を行った後、菌体を遠心操作により回収した。その後、菌体からのDNA抽出は、Hoffman and Winstonの方法 (Gen 57267-272(1987)) に従って行った。このDNA溶液1-50ng/ μ lを鋳型に、TakaraExTaq (登録商標、宝酒造) を用いてプライマール通りに反応溶液を調整した。プライマールの合成は、FEMS MICROBIOLOGY LETTERS 108,259-264,1993に記載のプライマール配列を用いて、サワディーテクノロジー (株) に委託した。PCRは、アステック社のPROGRAM TEMP CONTROL SYSTEM PC-800を用い、増幅反応を行った。反応条件は、94℃5分間の変性後、94℃、2分30秒間の変性→55℃1分30秒間のプライマールのアニーリング→72℃、3分間の合成反応のサイクルを25サイクル行った。但し、使用したプライマールはこれに限定されず、5SrRNA及び26SrRNAをコードする塩基配列のものでかまわない。PCR終了後の増幅DNA 500ngを、TAKAクローニングキット (INVITROGEN社) に含まれるプラスミドPCR2.1を2 μ l、リガーゼを1 μ l、バッファーを1 μ l、滅菌水を全量10 μ lになるように加え、16℃、一晚反応させた後、その2 μ lと0.5Mメルカプトエタノール2 μ lをともに大腸菌INV α 'Fコンピテントセルに加え、水中、30分間放置したのち、42℃、30秒間熱処理し、大腸菌へのプラスミドの形質転換を行った。形質転換した大腸菌にSOC培地 (2.0% Tryptone、0.5% Yeast Extract、10mM NaCl、2.5mM KCl、10mM MgCl₂·6H₂O、20mM glucose) 250 μ lを加え、37℃、60分間振とうした後、50 μ g/mlアンピシリン及び40 μ g/ml X-Galを含むLB平板培地に植菌し、37℃、一晚培養した。現れた白色のコロニーを50 μ g/mlアンピシリンを含む2mlのLB液体培地に接種し、37℃、一晚培養した。培養後、大腸菌よりプラスミドミニキット (QUIAGEN社) を用いてプラスミド抽出した。得られたプラスミドの一部を取り、制限酵素EcoRI (宝酒造社) により37℃、60分間反応させた後、アガロース電気泳動を行い、エチジウムブロマイドの染色により、26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスぺーサー領域が挿入さ

れていることを確認した。

【0017】このようにして得られたプラスミドを鋳型とし、シーケンス反応をおこなった。シーケンスプライマールはIRD11 Infrared Dye Labeled m13 Forwardプライマール及びIRD41 Infrared Dye Labeled m13 Reverseプライマール (目清紡社製造、アロカ (株) 販売) を、反応液はSequiTherm (登録商標) Long-Read (登録商標) Cycle SEQUENCING Kit-LC (EPICENTRE TECHNOLOGIES社製) を使用した。塩基配列決定は、4000L Long ReadIR (登録商標) DNA Sequencing System (LI-COR社製) を用いた。

【0018】その結果、得られた各下面発酵ビール酵母の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスぺーサー領域塩基配列を配列表に記載した。

【0019】配列番号1は、下面発酵ビール酵母BF1の塩基配列を示す。配列番号2は、下面発酵ビール酵母IFO2003の塩基配列を示す。配列番号3は、下面発酵ビール酵母CBS1513の塩基配列を示す。配列番号4は、サッカロマイセス・バストリアヌス (*Saccharomyces pastorianus*) タイプ・ストレインCBS1538の塩基配列を示す。配列番号5は、サッカロマイセス・バヤナス (*Saccharomyces bayanus*) CBS380の塩基配列を示す。

【0020】実施例3

プライマールの合成

実施例2の塩基配列の相同性を比較した結果、塩基配列上からも下面発酵ビール酵母は、下面発酵ビール酵母BF1と下面発酵ビール酵母IFO2003のグループと、下面発酵ビール酵母CBS1513とサッカロマイセス・バストリアヌス (*Saccharomyces pastorianus*) タイプ・ストレインCBS1538のグループに分類されることが確認された。そこで、その差異が確認された部分を参考に、PCRの増幅用にプライマールを設計し合成した。

【0021】配列番号1をもとに、DNASIS (日立ソフトウェアエンジニアリング (株)) を用いて下面発酵ビール酵母BF1を含むグループに特異的な配列を解析した。その結果、配列番号1の下面発酵ビール酵母BF1の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスぺーサー領域の遺伝子配列上の1021番目から1050番目までの配列を選定した。プライマールの合成は、サワディーテクノロジー (株) に委託した。合成したプライマール①のオリゴヌクレオチド配列を配列番号6に示す。

【0022】また、同様の解析により、配列番号3をもとに、下面発酵ビール酵母CBS1513を含むグループに特異的な配列を解析した。その結果、配列番号3の下面発酵ビール酵母CBS1513の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスぺーサー領域の遺伝子配列上の971番目から

1000番目までの配列を選定した。このオリゴヌクレオチドを実施例1と同様の方法で化学合成した。合成したプライマー②のオリゴヌクレオチド配列を配列番号7に示す。また、両プライマーを組み合わせて利用するプライマーとしては、FEMS MICROBIOLOGY LETTERS 108, 259-264, 1993の中に報告されているETS2プライマーを利用することとし、前記合成法と同様に合成した。合成したプライマー③のオリゴヌクレオチド配列を配列番号8に示す。

【0023】実施例4

プライマーの違いによるPCR増幅産物に基づく下面発酵ビール酵母の分類

下面発酵ビール酵母BF1、下面発酵ビール酵母BF2、下面発酵ビール酵母CBS1513、下面発酵ビール酵母IFO2003、サッカロマイセス・パストリアヌス (*Saccharomyces pastorianus*) タイプ・ストレインCBS1538、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) X2180-1A、上面発酵ビール酵母TF1、サッカロマイセス・バヤナス (*Saccharomyces bayanus*) CBS380を試験に用いた。

【0024】上記酵母より、実施例1と同様にDNAを抽出し、上記合成プライマー①及び③を用いてPCRを行った。PCRは実施例1と同様に行った。PCR反応後、5 μ lの反応液をとり、アガロースゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイドでDNAを染色して、増幅されたDNAを確認した。ゲルの観察または撮影した写真より、増幅産物の塩基長を分子量マーカーとの相対

移動度から求めた。その結果、図2Aに示されるように、下面発酵ビール酵母BF1、下面発酵ビール酵母BF2、下面発酵ビール酵母IFO2003 (レーン1、5、6)にのみ約1100bpのバンドが検出された。同様に、上記合成プライマー②及び③を用いてPCRを行い、増幅産物の塩基長を調べたところ、図2Bに示されるように、下面発酵ビール酵母CBS1513、サッカロマイセス・パストリアヌス (*Saccharomyces pastorianus*) タイプ・ストレインCBS1538、(レーン7、9)にのみ約1000bpのバンドが検出された。

【0025】

【発明の効果】本発明により、下面発酵ビール酵母BF1、CBS1513、IFO2003、サッカロマイセス・パストリアヌス (*Saccharomyces pastorianus*) タイプ・ストレインCBS1538、及びサッカロマイセス・バヤナス (*Saccharomyces bayanus*) タイプ・ストレインCBS380の、26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスペーサー領域の遺伝子が明らかになり、この遺伝子配列の全部または一部を用いた、下面発酵ビール酵母を分類する方法が提供された。そして、それらのスペーサー領域を本発明のプライマーを用いて、PCR法にて増幅し、その増幅産物を比較することにより、より詳細な下面発酵ビール酵母の分類、同定が可能となり、ビールの製造や品質管理に大きな貢献をするものと期待できる。

【0026】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

(110) Asahi Breweries, Ltd

(120) Novel oligonucleotide for differentiation of yeasts and a differentiation method using them.

(130) 9873-29

(160) 9

(210) 1

(211) 1432

(212) DNA

(213) Bottom fermenting yeast BF1

(400) 1

```
caactgtagt taagctgcta agagcctgac cgastagtgt agtgggtgac catacgcgaa 60
actcagglgc tgcacatctt atttcttttt ttttttttt ttttttttt tctagtttct 120
tggcttccca tgcataatcc cataactaac ctaccatleg attcagaaaa attcgcacta 180
tccagctgca ctcttcttct gaagagttaa gcactccatt atgctcattg ggttgcact 240
acttgataig tacaacaat atttctctcc galattccca caaaaaaaaa aaacacctcc 300
ggttttggtc tcttctctcc atttctctct ctctctaggt taactcttcc ccttctgct 360
ttttctacac cctcttttag ttgctttttt tctctctccg ctctctgca ctaacatttt 420
ggcgcaglac actalacgat cgtagtcact ctacacac cgcataccgc gtgcacaaaa 480
atttactleg caaacattc catacttgtt aagtatacat gtatataat tgcactgget 540
attcatcttg cacttttctt cttttttttt cccagtagcc tctctctttt acgtgcctc 600
tctgcaactt gccalcatca tttcttagaa actgccattt acttcaaaaa aaatgltccc 660
cactgttccac tgttactgtt tcaactgtct ctacatctt tcttggtaaa atcgtagttc 720
```

glaglallll llllcalalc aaaggeatgl eelglilacl alaggaaalg agelllllele 780
 aattctetaa acttataaaa geacteatgt ttgcegetet gatgatggg aaaaaactgc 840
 lccalgaage aaacigleeg ggcaaalcccl llaageleg ggaagelleg lgaagcccl 900
 lclcllllta cccalccllg caacgaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa gaaaalaaa 960
 aataaaaaga ccaaatagta aatgstacac tcttacacac tateatectc ategtatatt 1020
 ataatasata tatacaatac atgtttttac ccgatacata gatttcttaa gacaaataaa 1080
 alllalagag accllgllcag lclaccllele lclaaacag gccccggcle clgccaglac 1140
 ccaettagaa agaaataaaa aaacaaatca gacacaaag gettaatectc ascagatcgt 1200
 aacacaaagc ctactctact gcttacaata ccccgttgta catetaagtc gtatacaaat 1260
 galllalecc caagcaaaal gacallgcaa lligccagca agcaccraag gccllleccg 1320
 caagtgcacc gtgctagcc tctataggtt cagcgaccc acaaggaagc ettattcgta 1380
 tccatetata ttgtgtgag caaagaaate acccggttct acatggaatt ct 1432

(210) 2

(211) 1429

(212) DNA

(213) Bottom fermenting yeast IF02003

(400) 2

caaciglagl laagclggla agagcclgac cgaglaglgl aglgggtgac catacgcgaa 60
 acleagglgc tgaatclll allclllll lllllllll lllllllll claglllell 120
 gacttctat gctaaatccc ataaactaac taccattcga ttcagaaaaa ttgcactat 180
 ccagclgcac lclcllelg aagagllaag caccclatla lgcclallgg gllgclacla 240
 cllgalaigl acaaaacata lclccclcg alallccclac aaaaaaaaaa acaccccggl 300
 tttgttctct tccctccatt tccctctctt ctacggttaa tctttccccc ttgtctttt 360
 tctacacct cgttttagtt ctctttttt ctcccgcctt tctgcaata acattttgcc 420
 gcaglacael alacgalegl aglacatcll acaacccgcg alaccgcgcl gccaaaaall 480
 laclecgca acccllccal atclgllaag talacatgla talatallge acggclatl 540
 catcllgcac lllclclll lclclleccc aglagiclca lcllllaag clgcclclcl 600
 gcaactgcc atcctcatte cctagaaact gccatttact taaaaaaaa atgtccccc 660
 tglacclgl lcaclgllea cllgclclll acalcclll lgglaaaale glagllcgla 720
 glatllllll ccalatcaaa ggcclgclct glaaclala ggaaatgagc lllclcaat 780
 tctctaaact tataaaagca ttcattgttg ccctctgat ggtgcgaaa aaactgctcc 840
 atgaagcaaa ctgtccgggc aaatccctt acgtccgga agcttcctga aagccctct 900
 cllllaaccc alclllgcaa cgaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaagaa aalaaaaal 960
 aaaaagacca aatagtaaat gtacactct tacacactat cctctcctc gtatattata 1020
 atagatatat acaacacatg tttttaccg gatcatagag ttcttaagac aaataaaatt 1080
 talagagael lglcagcll acclclclcl aaactagcc ccggclcccl ccaglaccca 1140
 cttagaanga aataaaaaa caateagac aacaaagct taatctcagc agatcgtaac 1200
 aacaagcta ctctactgt tacaataccc cgtgtacat ctaagtcgta tacaatgat 1260
 llaacccac gcaaaalgac allgcaalle gccagcaagc acccaagcc lllccgcaaa 1320
 glgcacgll gclagccclg talggllcag cgaagccaca aggaagcccl allcglatcc 1380
 atctatattg tgtgagcaa agaatcacc gcgttctagc atgattct 1429

(210) 3

(211) 1386

(212) DNA

(213) Bottom fermenting yeast CBS1513

(400) 3

caactgtagt taagctgga agagccgac cgagtatgt agtgggtgac catacgcgaa 60
 acleagglgc tgaatclll alallllll llllgclall cctclalac tacaattcac 120
 glglaacgla cccllegall cagaaaaacc cglactalcc agctgcactc lllclcaaa 180

gagelalgea caacacglge allglillac lgellgalgl glaellgell alllellacl 240
 tteteeteeg atatteette ceeteegst tttttttttt ettgttttte ttetgeacat 300
 acgglilacl ellegleell lileaceege legllcaall cellallall cellilegel 360
 lileelligaa alcaaceege aciaacatll ceegcalac elalalalcl leglacaccl 420
 tacaaateeg aagaceegst egacaaaaat caactette gatagectea tttettatat 480
 aggtagecat caettttttg tttttteegt gctatatat gtatatatgt ettettittt 540
 celgelaaga gacccaacac lacllllllg elglalalac elaelcacac eglacelcaa 600
 aatecaaaage ctettecaet gtacacatt tactettaat egcttccat aactettact 660
 ctettgtaa aatcgtagt ttagtatatt ttttgtaa ggstaegce caegactat 720
 agaagalga gelilecaa lilellagag laalgaage celcaglll ceegclclca 780
 tggtecgaaa aaaaaagaa tttttetta actatactgt ceggaacac ttttegeet 840
 cegstaaget ttgtaaaagc cettgtatat cagcgcgtct ttgcacaga aacaaaaag 900
 caalegaaa ggcaglcic aaaaalaall ggaaellag calcaccac lgclclcaa 960
 gelglilacat aclaccaca cegclacac ceagellac ceggacala cagalellaa 1020
 gacaaataa atttatagag acttgteag teatactct ctetaaacta gsetcegst 1080
 celgceagla alageccac lagaagaaa laaaaaaca alcagacac aaggellaa 1140
 lclacagaa leglaacac aagctalc laclgellac aalacccgl lglacalcl 1200
 agtegtata aatgattta teccacgca aatgacatt geattgec acaagcacc 1260
 caaggeclll cegecaaglg caccglgel agcclgelal gtlcagca cgcacaagg 1320
 acgecllall cglacalc talglglgl ggagcaaga aalcacceg lclagcalg 1380
 gattct 1386

(210) 4

(211) 1387

(212) DNA

(213) *Saccharomyces pastorianus* Type strain CBS1538

(400) 4

caaclglagl laagclggla agagclgac egaglaglgl aglggglgac calacgegaa 60
 actcagstgc tgaatcttt atatttttt tttttctat teetctatac gtacaattca 120
 cglglaaegl accallegal leagaaaaac ceglacalc cagclgacl clillleclaa 180
 agagelatgc acaacaglg calglilla elgelgag lglacilgel lallcllacc 240
 tteteeteeg gatattctt ceeteegst tttttttttt ttettgtttt tettegcaca 300
 ctacggttta ctettgtee tttttaccc gctcttcaa ttettatta ttettittcg 360
 clilllecllg aalcalccc geaclaacat lileegcala ceclalalcl elleglacac 420
 ettacaaate cgaagaccg gtgcacaaaa atcaactct tgatagect catttettat 480
 ataggtasec atactcttt tgttttttcc gtgctatat atgtatatat gtettettte 540
 lilelgclaa gggacccaac aclacllll lgelglalal acclacac accglaccl 600
 aaaatcaaaa gctettcca ctgtacacac tttactetta atgecttcc ataactctg 660
 ctctcttggt aaaatctag ttgtagtat ttttttgct aagsgtaegc cccacgaact 720
 alagaagatg aggettlcic aallcllccag agtaalgcaa gcccclalgl lileegclcl 780
 calgglegga aaaaaaaga acglitctt aaclalac glccgggcaa actclttcgc 840
 teegstaagc ttgtaaaag cctgtata tcagcgctc ttgcagcag aaacaaaaa 900
 gcaalegaaa aggcagclcl caaaaalaal lggaaclla gealcaccac clglclclca 960
 agclglaca laclaccac accglacaa ccagcllla ceggacal acagcllla 1020
 agacaaataa aatttataga gaettgtca gtctactcc tetetaact agsetcegc 1080
 lclgceagl aalagccac ltagaagaa alaaaaaca aalcagaca caaggetlla 1140
 alclacagc alglacaa caagctacl claclgclla caalacccg lltacalcl 1200
 aagtegtata caatgattt atcccacgc aaaatgacat tgaattcgt cagcaagc 1260
 ccaaggecll lccgcaagl gcacglgc tagcclgela lgttcagcg acccacaag 1320
 gacgecllat lclatccat clatglglg lggagcaag aalcacceg gtlclagcal 1380

ggatttct	1387
(210) 5	
(211) 1386	
(212) DNA	
(213) <i>Saccharomyces bayanus</i> Type strain CBS380	
(400) 5	
caactgtagt taagctggta agagctgac cgagtagtgi agtgggtgac calacgegaa 60	
actcaggtgc tgaattcttt atattttttt ttttctatt cctctatacg tacaattcac 120	
gttaacgta ccattegatt cagaaaaac ctaactatcc agctgcactc ttttctaaa 180	
gagctatgca caacacgagc attgllllac tgcctgatgi glactlgell attclllaccl 240	
ttctectees atatttcctt cctctcggtt tttttttttt ctgtttttt ttgcacact 300	
acgttttact ctctgtcctt ttctaccgc tcttcaatt ccttattatt cttttctgt 360	
ttcclllgaa atcaccgcgc acaaacatt cccgcatacc ctatatalet leglacaccl 420	
tacaaatcg aagaccgcgt cgacaaaaal caactcttcc gacgcctca ttclllatal 480	
aggtaccat cactcttttg ttttttcgt gctatatat gtatatatgt cttctttctt 540	
cctgelaaga gacccaacac tacllllllg clglatalac clactcacac cgtaacaca 600	
aalcacaaag ctcllccact glacacactt taclcllaal cgcctlccat aactcllgl 660	
ctcttgataa aatcgtatgt tctagtattt ttttgataa ggtacgcgc cagcaactat 720	
agaagatgag gclllclcaa ttcllcagag taalgcaag cclcatglll cccgtclca 780	
tggtccgaaa aaaaagaac lgtllcllta actataclgl cggggcaaac lctllcgct 840	
cggtaagct ttataaaagc cctgtatat cagcgctct ttgcacaga aacaaaaaag 900	
caaalcgaaa ggcacgctc aaaaalaatl ggaacttag caccaccac lgtclclcaa 960	
gclgllacat actaccacta ccgcladaac ccagctllac ccggalcata cagatcllta 1020	
sacaaataaa atttatagag acttgctcag tcatactct ctctaaacta gctcccgct 1080	
cctcccagta atagccact tagaaagaaa taaaaacaa atcagacac aaggcttaa 1140	
tcacacaga tclgaacac aaggclact taclgcttac aalaccctgt tglacalcla 1200	
agclglatac aaalgallta tcccacgca aalgaacat gcaatlcgc agcaagcacc 1260	
caaggcclll ccgcaagtg caccgllgel agcclgelat ggtcagcga cgcacaagg 1320	
acgccttatt cgtatccatc tatgttgtgt gtagcaaga aatcccgcs ttctagcatg 1380	
gattcl	1386
(210) 6	
(211) 30	
(212) DNA	
(213) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> X2180-1A	
(400) 6	
tatatctatt ataataacg atgaggtatg	30
(210) 7	
(211) 30	
(212) DNA	
(213) <i>Saccharomyces bayanus</i> Type strain CBS380	
(400) 7	
(401)	
ggtagtggtg gtagglaaca gctlgagaga	30
(210) 8	
(211) 19	
(212) DNA	
(213) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> X2180-1A	
(400) 8	

caccgtttcc cgtccgat.

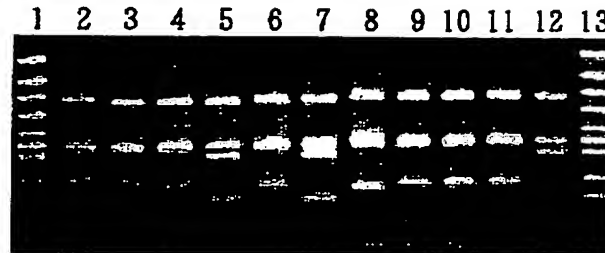
19

【図面の簡単な説明】

【図2】実施例4における電気泳動図。

【図1】実施例1における電気泳動図。

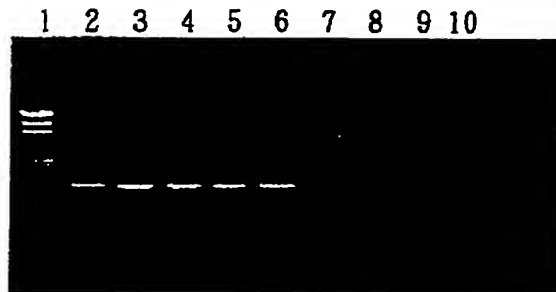
【図1】

A. Msp I により切断B. ScrFI により切断

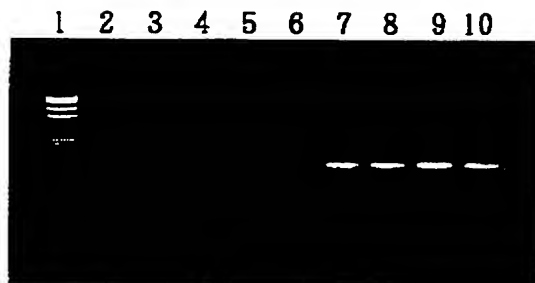
- レーン 1 : マーカー ϕ X174-HincII
 レーン 2 : サッカロマイセス・セレビスエ X2180-1A
 レーン 3 : 下面発酵ビール酵母BF1
 レーン 4 : 下面発酵ビール酵母BF2
 レーン 5 : 下面発酵ビール酵母CBS1513
 レーン 6 : 下面発酵ビール酵母IFO2003
 レーン 7 : サッカロマイセス・パストリアヌス
 タイプ・ストレインCBS1538
 レーン 8 : 下面発酵ビール酵母ATCC10596
 レーン 9 : 下面発酵ビール酵母NCYC529
 レーン10 : 下面発酵ビール酵母NCYC1047
 レーン11 : 下面発酵ビール酵母IFO10012
 レーン12 : サッカロマイセス・バヤナス CBS380
 レーン13 : マーカー ϕ X174-HincII

【図2】

A. プライマー①及び③を用いた PCR



B. プライマー②及び③を用いた PCR



- レーン 1 : マーカー λ -HindIII
レーン 2 : サッカロマイセス・セレビシエ X2180-1A
レーン 3 : 上面発酵ビール酵母TF1
レーン 4 : 下面発酵ビール酵母BF1
レーン 5 : 下面発酵ビール酵母BF2
レーン 6 : 下面発酵ビール酵母IFO2003
レーン 7 : 下面発酵ビール酵母CBS1513
レーン 8 : サッカロマイセス・バヤナス CBS380
レーン 9 : サッカロマイセス・パストリアヌス
タイプ・ストレインCBS1538
レーン10 : サッカロマイセス・モナセンシス CBS 1503

フロントページの続き

(51)Int.Cl.7

識別記号

F1

キーワード(参考)

C12R 1:85)

Fターム(参考) 4B024 AA11 AA20 BAS0 CA09 CA11
DA06 EAO4 FA18 GA30 HA12
4B063 QA13 QA18 QQ07 QQ54 QR35
QR40 QR55 QR62 QR76 QS25
QS34

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2001-8684
(P2001-8684A)

(43) 公開日 平成13年1月16日 (2001.1.16)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームト [*] (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 Q 1/68	A 4 B 0 6 3
// (C 1 2 N 15/09	Z N A		
C 1 2 R 1:85)			
(C 1 2 Q 1/68			

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 11 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平11-179308

(22) 出願日 平成11年6月25日 (1999.6.25)

(71) 出願人 000000055

アサヒビール株式会社
東京都中央区京橋3丁目7番1号

(72) 発明者 山岸 裕美

茨城県北相馬郡守谷町緑1-1-21 アサ
ヒビール株式会社酒類研究所内

(72) 発明者 尾形 智夫

東京都大田区大森北2-13-1 アサヒビ
ール株式会社東京工場内

(74) 代理人 100083714

弁理士 舟橋 榮子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規オリゴヌクレオチドとそれを用いた酵母分類法

(57) 【要約】

【課題】本発明は、下面発酵ビール酵母を分類するのに利用可能なオリゴヌクレオチド及びそれを利用した下面発酵ビール酵母の分類方法を提供する。

【解決手段】下面発酵ビール酵母及びサッカロマイセス・バヤナス (*Saccharomyces bayanus*) の26 S r R N A をコードする遺伝子と5 S r R N A をコードする遺伝子との間のスペーサー領域の遺伝子を明らかにし、この遺伝子配列の全部または一部を用いて、下面発酵ビール酵母を分類した。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1に示される塩基配列の一部または全部を含む下面発酵ビール酵母HFDの26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスペーサー領域の遺伝子配列、

【請求項2】 配列番号2に示される塩基配列の一部または全部を含む下面発酵ビール酵母HFD2003の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスペーサー領域の遺伝子配列、

【請求項3】 配列番号3に示される塩基配列の一部または全部を含む下面発酵ビール酵母CBS1513の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスペーサー領域の遺伝子配列、

【請求項4】 配列番号4に示される塩基配列の一部または全部を含むサッカロマイセス・パストリアヌス (*Saccharomyces pastorianus*) タイプストレインCBS1538の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスペーサー領域の遺伝子配列、

【請求項5】 配列番号5に示される塩基配列の一部または全部を含むサッカロマイセス・バヤナス (*Saccharomyces bayanus*) タイプストレインCBS380の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスペーサー領域の遺伝子配列、

【請求項6】 下面発酵ビール酵母の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスペーサー領域の遺伝子配列が以下の配列、

5'-TATATCTATTATAAATATACGATGAGGATGA-3' ①

を有するか、または対応する相補的配列を有することを特徴とするオリゴヌクレオチド、

【請求項7】 下面発酵ビール酵母の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスペーサー領域の遺伝子配列が以下の配列、

5'-GGTAGTGGTAGTATGTAAACAGCTTGAGAGA-3' ②

を有するか、または対応する相補的配列を有することを特徴とするオリゴヌクレオチド、

【請求項8】 請求項1から5に記載された遺伝子配列より作成したオリゴヌクレオチドあるいは請求項6あるいは7に記載されたオリゴヌクレオチドと26SrRNAより作成したオリゴヌクレオチドを、核酸合成のプライマーとして機能させ、遺伝子増幅処理することによって酵母を分類する方法、

【請求項9】 請求項8記載の遺伝子増幅処理により得られた遺伝子増幅産物をプローブとして作用させ、サザンハイブリダイゼーションを行い、酵母を分類する方法、

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、酵母を分類するのに利

用可能な遺伝子及びそれを利用した酵母の分類方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 近年、酵母の染色体構造の解析と酵母の分類法について各種の報告がある。例えば、J GEN APPL MICROBIOL, VOL. 41, NO. 3, 239-247, 1995には、サッカロマイセス・バヤナス (*Saccharomyces bayanus*)、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、下面発酵ビール酵母について電気泳動的核型を検討し、その結果から下面発酵ビール酵母がサッカロマイセス・バヤナス (*Saccharomyces bayanus*) とサッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) との交雑体であることが記載されている。また、日本農芸化学1998年大会要旨集13ページ、2A7p24には、パルスフィールドゲル電気泳動とサザンハイブリダイゼーションにより下面発酵ビール酵母の染色体構造を検討した結果、下面発酵ビール酵母はサッカロマイセス・バヤナス (*Saccharomyces bayanus*) とサッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) との交雑体であることが報告されている。一方、FEMS MICROBIOLOGY LETTERS 108, 259-264, 1993には、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、サッカロマイセス・カールスベルゲンシス (*Saccharomyces carlsbergensis*)、サッカロマイセス・パストリアヌス (*Saccharomyces pastorianus*) の3種の酵母について、26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスペーサー領域のPCR産物の制限酵素断片長を比較している。さらに、本発明者らは、特開平11-56366「酵母を同定する方法」にて、rDNAの一部のPCR産物及び制限酵素断片長多型性とを組み合わせたビール醸造用酵母と非醸造用酵母を分類同定する方法を開示している。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 これらの従来技術をもとに、検討する酵母がサッカロマイセス (*Saccharomyces*) 属のどの種に該当するのか確認したり、ビール醸造用酵母と非醸造用酵母の分類を行うことは可能である。しかしながら、今日では、さらにビール醸造用の下面発酵ビール酵母においても、できるだけ個々の酵母に対する細やかな分類が望まれており、その課題については従来の報告内容ではその要望は達成が困難である。そこで、本発明では、下面発酵ビール酵母におけるより詳細な分類・同定に利用できる方法を提供することを目的とする。

【0004】

【課題を解決するための手段】 上記の課題を解決するために、鋭意研究を行った結果、下面発酵ビール酵母各株の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスペーサー領域を含むDNAの塩基配列を決定し、この塩基配列よりプライマーを作

製し、当該DNAをPCR(ポリメラーゼ・チェーン・リアクション)法にて増幅し、その増幅産物を比較することにより、下面発酵ビール酵母を分類・同定できることを見だし、本発明を完成させた。

【0005】従って、(1)第1の発明は、配列番号1に示される塩基配列の一部または全部を含む下面発酵ビール酵母BF1の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスパーサー領域の遺伝子配列である。(2)第2の発明は、配列番号2に示される塩基配列の一部または全部を含む下面発酵ビール酵母IFO2003の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスパーサー領域の遺伝子配列である。

(3)第3の発明は、配列番号3に示される塩基配列の一部または全部を含む下面発酵ビール酵母CBS1513の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスパーサー領域の遺伝子配列である。

(4)第4の発明は、配列番号4に示される塩基配列の一部または全部を含むサッカロマイセス・パストリアヌス(*Saccharomyces pastorianus*)タイプストレインCBS1538の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスパーサー領域の遺伝子配列である。

(5)第5の発明は、配列番号5に示される塩基配列の一部または全部を含むサッカロマイセス・バヤナス(*Saccharomyces bayanus*)タイプストレインCBS380の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスパーサー領域の遺伝子配列である。

(6)第6の発明は、下面発酵ビール酵母の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスパーサー領域の遺伝子配列が以下の配列、

5'-TATATCTATTATAATATACGATGAGGATGA-3' ①

を有するか、または対応する相補的配列を有することを特徴とするオリゴヌクレオチドである。

(7)第7の発明は、下面発酵ビール酵母の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスパーサー領域の遺伝子配列が以下の配列、

5'-GGTAGTGGTAGTATGTAACAGCTTGAGAGA-3' ②

を有するか、または対応する相補的配列を有することを特徴とするオリゴヌクレオチドである。

(8)第8の発明は、上記(1)から(5)に記載された遺伝子配列より作成したオリゴヌクレオチドあるいは上記(6)及び(7)に記載されたオリゴヌクレオチドと26SrRNAより作成したオリゴヌクレオチドを、

核酸合成のプライマーとして機能させ、遺伝子増幅処理することによって下面発酵ビール酵母を分類する方法である。

(9)第9の発明は、上記第8の発明において得られる遺伝子増幅産物をプローブとして作用させ、サザンハイブリダイゼーションを行い、酵母を分類する方法である。

【0006】本発明で実施する遺伝子増幅に関する技術は既に公知である。本技術は、特定の遺伝子配列を増幅させる反応であり、迅速・高感度で高い特異性を持ちかつ簡便であることから現在広い分野で利用されている。本発明においても、Saikiらが開発したPolymerase Chain Reaction法(以下、PCR法と略す; Science 230,1350,1985)を参考にして実施することができる。

【0007】

【発明の実施の形態】本発明の概要を説明する。

(1)まず、下面発酵ビール酵母、サッカロマイセス・バヤナス(*Saccharomyces bayanus*)、サッカロマイセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスパーサー領域のPCR産物について制限酵素で切断し、得られた制限酵素切断パターンを比較する。制限酵素には、MspI、SrfIIを利用できる。MspIとSrfIIを制限酵素として利用した場合、その切断パターンから下面発酵ビール酵母は2タイプに分類される。

(2)次に、下面発酵ビール酵母、サッカロマイセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)、サッカロマイセス・バヤナス(*Saccharomyces bayanus*)の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスパーサー領域の塩基配列を決定する。塩基配列の決定方法は、公知の4000L Long ReadIR(登録商標)DNA Sequencing System(LI-COR社製)の方法を利用することができる。得られた塩基配列の相同性を比較検討し、異なる塩基配列部分を確認する。サッカロマイセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)及びサッカロマイセス・バヤナス(*Saccharomyces bayanus*)との相同性を検討すると、下面発酵ビール酵母は2タイプに分類される。配列の違う部分は、配列番号1の101番目から1157番目、配列番号2の101番目から1154番目、配列番号3の101番目から1112番目、配列番号4の101番目から1113番目、配列番号5の101番目から1112番目である。

【0008】(3)(2)で決定した配列のうち、同じタイプの下面発酵ビール酵母にのみPCR増幅産物が得られるようなプライマーを設計し、合成する。合成方法は既知の方法で実施できる。プライマーとなる塩基配列は、配列番号6及び7に示したものは一例であり、これに限定されるものではない。

(4)同じタイプの下面発酵ビール酵母にのみPCR増幅産物が得られるようなプライマーとそれらプライマー

に組み合わせて共通して使用するプライマーを用いた。組み合わせて共通して使用するプライマー③のオリゴヌクレオチド配列を配列番号8に示す。但し、このプライマーはこのものに限定されるものではなく、26S rRNAをコードする塩基配列のものであればかまわない。これらプライマーを用いて、検討する下面発酵ビール酵母の遺伝子をPCR法で増幅させ、どちらの分類に属するかを決定する。(1)の方法はrDNAスペーサー領域の一部をPCRにより増幅させ、その増幅産物を制限酵素で切断してパターンを比較する方法で、下面発酵ビール酵母を分類することができるが2段階の試験を必要とする。しかし、本方法はrDNAスペーサー領域の下面発酵ビール酵母間で確実に差異のある部分をPCR法で増幅させて増幅の有無により分類するという簡単に確実な方法である。また、実施例以外のビール酵母にも十分応用可能な方法と考えられる。

(5)(4)の分類方法とは別の方法として、サザンハイブリダイゼーションによる分類方法がある。すなわち、(4)で増幅した産物をプローブとして、下面発酵ビール酵母のDNAに作用させてサザンハイブリダイゼーションを行い、どちらの分類に属するかを決定する。

【0009】本発明の配列表について説明する。配列番号1は、配列の長さが1432、配列の型が核酸、鎖の数が2本鎖、トポロジーが直鎖状、配列の種類がgenomic DNA。起源が下面発酵ビール酵母BF1の配列である。配列番号2は、配列の長さが1429、配列の型が核酸、鎖の数が2本鎖、トポロジーが直鎖状、配列の種類がgenomic DNA。起源が下面発酵ビール酵母IFO2003の配列である。

【0010】配列番号3は、配列の長さが1386、配列の型が核酸、鎖の数が2本鎖、トポロジーが直鎖状、配列の種類がgenomic DNA。起源が下面発酵ビール酵母CBS1513の配列である。配列番号4は、配列の長さが1387、配列の型が核酸、鎖の数が2本鎖、トポロジーが直鎖状、配列の種類がgenomic DNA。起源がサッカロマイセス・パストリアス(*Saccharomyces pastorianus*)タイプ・ストレインCBS1538の配列である。配列番号5は、配列の長さが1386、配列の型が核酸、鎖の数が2本鎖、トポロジーが直鎖状、配列の種類がgenomic DNA。起源がサッカロマイセス・バヤナス(*Saccharomyces bayanus*)CBS380の配列である。

【0011】配列番号6は、配列の長さが30、配列の型が核酸、鎖の数が2本鎖、トポロジーが直鎖状、配列の種類がgenomic DNA。起源が下面発酵ビール酵母IFO2003の配列である。配列番号7は、配列の長さが30、配列の型が核酸、鎖の数が2本鎖、トポロジーが直鎖状、配列の種類がgenomic DNA。起源が下面発酵ビール酵母CBS1513の配列である。

【0012】

【実施例】以下に、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されない。実施例1

下面発酵ビール酵母のrDNAスペーサー領域のPCR産物の制限酵素切断パターンの比較

下面発酵ビール酵母BF1、下面発酵ビール酵母BF2、下面発酵ビール酵母CBS1513、下面発酵ビール酵母IFO2003、サッカロマイセス・パストリアス(*Saccharomyces pastorianus*)タイプ・ストレインCBS1538下面発酵ビール酵母ATCC10596、下面発酵ビール酵母NCYC529、下面発酵ビール酵母NCYC1047、下面発酵ビール酵母IFO10012、サッカロマイセス・バヤナス(*Saccharomyces bayanus*)CBS380、及びサッカロマイセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*)X2180-1Aを試験に用いた。

【0013】上記酵母を適当な増殖用培地にて培養を行った後、菌体を遠心操作により回収した。その後、菌体からのDNA抽出は、Hoffman and Winstonの方法(Gene 57267-272(1987))に従って行った。このDNA溶液1-50ng/ μ lを鋳型に、TakaraExTaq(登録商標、宝酒造)を用いてプロトコール通りに反応溶液を調整した。プライマーの合成は、先行文献[FEMSマイクロバイオリソレーター(FEMS Microbiology Letters)]に記載のプライマー配列を用いて、サワディーテクノロジー(株)に委託した。PCRは、アステック社のPROGRAM TEMP CONTROL SYSTEM PC-800を用い、増幅反応を行った。反応条件は、94℃5分間の変性後、94℃、2分30秒間の変性-55℃1分30秒間のプライマーのアニーリング-72℃、3分間の合成反応のサイクルを25サイクル行った。反応後、5 μ lの反応液をとり、アガロースゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイドでDNAを染色して、増幅されたDNAを確認した。その後、この増幅産物の一部を取り、制限酵素MspI(TAKARA)またはSclFI(東洋紡社)により、37℃、60分間反応させた後、アガロースゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイドでDNAを染色して、制限酵素切断パターンを比較した。

【0014】その結果を図1に示した。図1からも明らかなように、下面発酵ビール酵母は、2つのタイプに分類されるのが確認された。グループ1には、下面発酵ビール酵母BF1、下面発酵ビール酵母BF2、下面発酵ビール酵母CBS1513、下面発酵ビール酵母IFO2003、下面発酵ビール酵母ATCC10596、下面発酵ビール酵母NCYC529、下面発酵ビール酵母NCYC1047、下面発酵ビール酵母IFO10012が属し、グループ2には、下面発酵ビール酵母CBS1513、サッカロマイセス・パストリアス(*Saccharomyces pastorianus*)タイプ・ストレインCBS1538が属していた。

【0015】実施例2

下面発酵ビール酵母の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスペーサー領域のクローニング及び塩基配列の決定

下面発酵ビール酵母BF1、下面発酵ビール酵母IFO2003、下面発酵ビール酵母CBS1513、サッカロマイセス・バストリアヌス (*Saccharomyces pastorianus*) タイプ・ストレインCBS1538の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスペーサー領域の塩基配列を決定した。

【0016】上記酵母を適当な増殖用培地にて培養を行った後、菌体を遠心操作により回収した。その後、菌体からのDNA抽出は、Hoffman and Winstonの方法 (Gene 57267-272(1987)) に従って行った。このDNA溶液1-50ng/ μ lを鋳型に、TakaraExTaq (登録商標、宝酒造) を用いてプライマー通りに反応溶液を調整した。プライマーの合成は、FEMS MICROBIOLOGY LETTERS 108,259-264,1993に記載のプライマー配列を用いて、サワディーテクノロジー (株) に委託した。PCRは、アステック社のPROGRAM TEMP CONTROL SYSTEM PC-800を用い、増幅反応を行った。反応条件は、94℃5分間の変性後、94℃、2分30秒間の変性→55℃1分30秒間のプライマーのアニーリング→72℃、3分間の合成反応のサイクルを25サイクル行った。但し、使用したプライマーはこれに限定されず、5SrRNA及び26SrRNAをコードする塩基配列のものでかまわない。PCR終了後の増幅DNA 500ngを、TAクローニングキット (INVITROGEN社) に含まれるプラスミドpCR2.1を2 μ l、リガーゼを1 μ l、バッファーを1 μ l、滅菌水を全量10 μ lになるように加え、16℃、一晚反応させた後、その2 μ lと0.5Mメルカプトエタノール2 μ lをともに大腸菌INV α Fコンピテントセルに加え、水中、30分間放置したのち、42℃、30秒間熱処理し、大腸菌へのプラスミドの形質転換を行った。形質転換した大腸菌にSOC培地 (2.0% Tryptone、0.5% Yeast Extract、10mM NaCl、2.5mM KCl、10mM MgCl₂·6H₂O、20mM glucose) 250 μ lを加え、37℃、60分間振とうした後、50 μ g/mlアンピシリン及び40 μ g/ml X-Galを含むLB平板培地に植菌し、37℃、一晚培養した。現れた白色のコロニーを50 μ g/mlアンピシリンを含む2mlのLB液体培地に接種し、37℃、一晚培養した。培養後、大腸菌よりプラスミドミニキット (QUAGEN社) を用いてプラスミド抽出した。得られたプラスミドの一部を取り、制限酵素EcoRI (宝酒造社) により37℃、60分間反応させた後、アガロース電気泳動を行い、エチジウムブロマイドの染色により、26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスペーサー領域が挿入さ

れていることを確認した。

【0017】このようにして得られたプラスミドを鋳型とし、シーケンス反応をおこなった。シーケンスプライマーはIRD41 Infared Dye Labeled m13 Forwardプライマー及びIRD41 Infared Dye Labeled m13 Reverseプライマー (日清紡社製造、アロカ (株) 販売) を、反応液はSequiTherm (登録商標) Long-Read (登録商標) Cycle SEQUENCING Kit-LC (EPICENTRE TECHNOLOGIES社製) を使用した。塩基配列決定は、4000L Long ReadIR (登録商標) DNA Sequencing System (LI-COR社製) を用いた。

【0018】その結果、得られた各下面発酵ビール酵母の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスペーサー領域塩基配列を配列表に記載した。

【0019】配列番号1は、下面発酵ビール酵母BF1の塩基配列を示す。配列番号2は、下面発酵ビール酵母IFO2003の塩基配列を示す。配列番号3は、下面発酵ビール酵母CBS1513の塩基配列を示す。配列番号4は、サッカロマイセス・バストリアヌス (*Saccharomyces pastorianus*) タイプ・ストレインCBS1538の塩基配列を示す。配列番号5は、サッカロマイセス・バヤナス (*Saccharomyces bayanus*) CBS380の塩基配列を示す。

【0020】実施例3

プライマーの合成

実施例2の塩基配列の相同性を比較した結果、塩基配列上からも下面発酵ビール酵母は、下面発酵ビール酵母BF1と下面発酵ビール酵母IFO2003のグループと、下面発酵ビール酵母CBS1513とサッカロマイセス・バストリアヌス (*Saccharomyces pastorianus*) タイプ・ストレインCBS1538のグループに分類されることが確認された。そこで、その差異が確認された部分を参考に、PCRの増幅用にプライマーを設計し合成した。

【0021】配列番号1をもとに、DNASIS (日立ソフトウェアエンジニアリング (株)) を用いて下面発酵ビール酵母BF1を含むグループに特異的な配列を解析した。その結果、配列番号1の下面発酵ビール酵母BF1の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスペーサー領域の遺伝子配列上の1021番目から1050番目までの配列を選定した。プライマーの合成は、サワディーテクノロジー (株) に委託した。合成したプライマー①のオリゴヌクレオチド配列を配列番号6に示す。

【0022】また、同様の解析により、配列番号3をもとに、下面発酵ビール酵母CBS1513を含むグループに特異的な配列を解析した。その結果、配列番号3の下面発酵ビール酵母CBS1513の26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスペーサー領域の遺伝子配列上の971番目から

1000番目までの配列を選定した。このオリゴヌクレオチドを実施例1と同様の方法で化学合成した。合成したプライマー②のオリゴヌクレオチド配列を配列番号7に示す。また、両プライマーと組み合わせて利用するプライマーとしては、FEMS MICROBIOLOGY LETTERS 108, 259-264, 1993の中に報告されているETS2プライマーを利用することとし、前記合成法と同様に合成した。合成したプライマー③のオリゴヌクレオチド配列を配列番号8に示す。

【0023】実施例4

プライマーの違いによるPCR増幅産物に基づく下面発酵ビール酵母の分類

下面発酵ビール酵母BF1、下面発酵ビール酵母BF2、下面発酵ビール酵母CBS1513、下面発酵ビール酵母IFO2003、サッカロマイセス・パストリアヌス (*Saccharomyces pastorianus*) タイプ・ストレインCBS1538、サッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) X2180-1A、上面発酵ビール酵母TF1、サッカロマイセス・バヤナス (*Saccharomyces bayanus*) CBS380を試験に用いた。

【0024】上記酵母より、実施例1と同様にDNAを抽出し、上記合成プライマー①及び③を用いてPCRを行った。PCRは実施例1と同様に行った。PCR反応後、5 μ lの反応液をとり、アガロースゲル電気泳動を行い、エチジウムブロマイドでDNAを染色して、増幅されたDNAを確認した。ゲルの観察または撮影した写真より、増幅産物の塩基長を分子量マーカーとの相対

移動度から求めた。その結果、図2Aに示されるように、下面発酵ビール酵母BF1、下面発酵ビール酵母BF2、下面発酵ビール酵母IFO2003 (レーン4、5、6) にのみ約1100bpのバンドが検出された。同様に、上記合成プライマー②及び③を用いてPCRを行い、増幅産物の塩基長を調べたところ、図2Bに示されるように、下面発酵ビール酵母CBS1513、サッカロマイセス・パストリアヌス (*Saccharomyces pastorianus*) タイプ・ストレインCBS1538、(レーン7、9) にのみ約1000bpのバンドが検出された。

【0025】

【発明の効果】本発明により、下面発酵ビール酵母BF1、CBS1513、IFO2003、サッカロマイセス・パストリアヌス (*Saccharomyces pastorianus*) タイプ・ストレインCBS1538、及びサッカロマイセス・バヤナス (*Saccharomyces bayanus*) タイプ・ストレインCBS380の、26SrRNAをコードする遺伝子と5SrRNAをコードする遺伝子との間のスペーサー領域の遺伝子が明らかになり、この遺伝子配列の全部または一部を用いた、下面発酵ビール酵母を分類する方法が提供された。そして、それらのスペーサー領域を本発明のプライマーを用いて、PCR法にて増幅し、その増幅産物を比較することにより、より詳細な下面発酵ビール酵母の分類、同定が可能となり、ビールの製造や品質管理に大きな貢献をするものと期待できる。

【0026】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

(110) Asahi Breweries, Ltd

(120) Novel oligonucleotide for differentiation of yeasts and a differentiation method using them.

(130) 9873-29

(160) 9

(210) 1

(211) 1432

(212) DNA

(213) Bottom fermenting yeast BF1

(400) 1

```
caactgtagt taagctgtag agagcctgac cgactagtgt agtgggtgac catacgcgaa 60
actcaggtgc tgcactcttt attctctttt tttttttt tttttttt tctagtttct 120
tggtctccta tgcataatcc calaacaaac claccalleg attcagaaaa attgcacta 180
tccagctgca ctctctctct gaagagttaa gcactccatt atctcattg gtttgcact 240
actgalatg tacaacaat attctctcc galattccta caaaaaaaaa aaacacccc 300
ggtttcttc tctctctcc attctctct ctctcaggt taactcttcc ccttctctct 360
ttttctaac cctcttttag ttctctctt tctctctcc cttctctgca ctacatttt 420
gcgcaglac actalacgat cgtaglacat cttaacaac cgcataccgc gtcgcaaaa 480
atttacttgc caaccattc catatctgtt aagtatacat glatatata tgcactggt 540
attcatcttg cacttttct cttctctct cccagtagcc tcatctttt acgtgcctc 600
tctgaactt gccatcata tccctagaa actgcattt actlaaaaa aaatgccc 660
cactgttcc tgttctctg tcatcttct cttaactct tcttggtaaa atcgtcttcc 720
```

glaglatlll llllcalalc aaaggeatgl eelgliaael alaggaaalg agellilele 780
 aattetetaa aettataaaa geacteatgt ttgeetetet gatagtscas aaaaaactse 840
 lccalgaage aaacglceeg ggcaaalceel llaegeteeg ggaagellcg lgaagccel 900
 lelellllaa cccalccllg caacgaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa gaaaalaaaa 960
 aataaaaaa ccaaatagta aatgstacac tcttacacac tateateete ategtatat 1020
 ataatagata tatacaatac atgtttttac eegsateata gatttettaa gacaaataaa 1080
 alllalagag actlglleag lclaellele lclaaactag gecccggele elgecaglac 1140
 ccaettasaa agaaataaaa aaacaaatea gacacaaag gettaateete asacagatgt 1200
 acaacaaag ctactetaet gettacaaata ccccggttga catetaagte gtatacaaat 1260
 galllalccc caacgaaaal gacallgcaa llegecagea agaccccaag geclllceeg 1320
 caagtacacc gttagtacc tctataggt cagacagcc acaaggacge ettatttgta 1380
 tccatetata ttgtatgag caaagaaate acccgattct acatagatt ct 1420

(210) 2

(211) 1429

(212) DNA

(213) Bottom fermenting yeast IF02003

(400) 2

caacglagl laagclggla agagcelgac egaglagtgi aglggglgac calacgegaa 60
 acleaggtgc lgaalcclll alllclllll lllllllll lllllllll claglllell 120
 gsetteetat getaaatecc ataactaacc taccattaga ttcagaaaaa ttgcactat 180
 ccagclgac lcllellclg aagagllaag caclccalla lgelcaligg gllgelacta 240
 ellgalatgi acaacaala lltccclcg alaltccac aaaaaaaaaa acclccggg 300
 tttgttetet tccctcatt tccctetett ctacgggtta tctttccce ttctttttt 360
 tetacacct cgtttagtts etttttttt etttccgett tctgcacta acattttgce 420
 gcaglacael alacgalegl agtacalccl acaacclccg alaccgggic gccaaaaall 480
 lacllgeca accallccal alclgliaag lalacatgla lalalallgc acggclall 540
 calcllgac lllclclll lclcllccc agtagcclea lcllllaag clgeclclcl 600
 gcaacttgc atcactatc cctagaaact gccatttact taaaaaaaa atgtccccc 660
 lglcactgl lcaclglca clglclclll acalcclllc lgglaaaalc glagllcgla 720
 glatllllll ccalalcaaa ggcattgcll gtlaaclala ggaaalgagc lllclcaal 780
 tetetaaact tataaaagca ttcattgttg cegctetgat ggtcgggaaa aaactgetcc 840
 atgaagcaaa ctgtccgggc aaatccttc acgtccgga agcttcctga aagcccttct 900
 cllllaacc alclllgcaa cgaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaagaa aalaaaaal 960
 aaaaagacca aatagtaaat ggtacactet tacacactat cactcctate gtatattata 1020
 atagatatat acaacacatg tttttaccg gacatagag ttcttaagac aaataaaatt 1080
 lalagagael lglcagtlcl acclclclcl aaclaggec cggclclcg ccaglaccca 1140
 cttagaaga aataaaaaa caaatcagac aacaaagget taatctcage agatctaac 1200
 aacaaggeta ctctactgt tacaataccc cgtttacat ctaagtgta tacaatgat 1260
 llaacccac gcaaaalgac aligcaalle gccagcaagc acccaaggec lllccgcaa 1320
 glcaccgll gelagcelgc lalggllcag cgagccaca aggaagcccl allcglatcc 1380
 atctatattg tctgagcaa agaaatcacc scgttctagc atgattct 1420

(210) 3

(211) 1386

(212) DNA

(213) Bottom fermenting yeast CBS1513

(400) 3

caactgtagt taactgtga agagcctgac egagtgtgt agtggtgac catacgegaa 60
 acleaggtgc lgaalcclll atatllllll llllgclall clcllalaag lacaallcac 120
 gtglacgla ccallegall cagaaaaacc cgtacalcc agclgcacle lltccclaaa 180

gagelalgea caacacglge allgllllac lgeillgalgl glaelllgell alllelllael 240
 tteteetceg atattteette ceetceeggt tttttttttt ttgtttttt ttetgecaet 300
 aegglilacl ellegleell llelacccege leglllaall cellallall cellllegel 360
 lleclligaa alcaacecege acilaacalll ceegcalacc elalatalal leglacacel 420
 tacaateeg aagaceeggt egacaaaat caactette gatagectea tttettatat 480
 aggtagecat caetttttt ttttttcegt gctatatat gtatatatgt ettttttett 540
 celgelaaga gacccaacac lacllllllg elglalalac elaelcaac eglaaclcaa 600
 aatcaaaage ctettecaet gtacacaett tactettaat cseettecat aactettget 660
 ctettgtaa aatgtagtt ttagtagttt ttttgtaa gatacgece caagaactat 720
 agaagalgag gellllecaa llellcagag laalgeaage celcalglll cegeleleca 780
 tggtecgaaa aaaaaaaga tgtttettaa actatactgt cgggcaaac tettegeet 840
 cegtaaget ttataaaage cettgtatat cagcgegtt ttgcagcaga aacaaaaaag 900
 caalegaaa ggcaglcclc aaaaalaall ggaaclllag calcaccacc lglclclcaa 960
 gelglllacl aclaccaccl cegeleaac ceagelllac ceggalcata cagclcllaa 1020
 gacaaataaa atttatagag acttgttcag tcatactct ctetaaacta gsetceeggt 1080
 celgecagla alageccael lagaagaaa laaaaaaaa alcagacac aagggcllaa 1140
 lelcagcaga leglaaacac aaggelact laelgellac aalacccegt lglacalcla 1200
 agtegtatac aaatgattta tccccagca aaatgacatt geaatgece agcaagcacc 1260
 caaggeclll cegecaaglg caecglgcll ageclgelal ggllcagcga cgcacaaag 1320
 aegcllall eglalccalc laiglllgll ggagcaaga aalcaceeg llelagaclg 1380
 gattet 1386

(210) 4

(211) 1387

(212) DNA

(213) *Saccharomyces pastorianus* Type strain CBS1538

(400) 4

caacglagll laagclggla agagcelgac egaglaglll aglggglgac calaccegaa 60
 actcaggtgc tgaattttt atattttttt tttttgtat teetctatac gtacaattca 120
 cglglaacgl accatlegal leagaaaaac cglacalac cagclgcacl etlllecllaa 180
 agagelalge acaacacglg callglllla elgelllagll lglaelllgel lallcllacc 240
 tteteetce gatattteet ceetceeggt tttttttttt ttettgttt ttetgecaa 300
 ctacggttta ctettegte ttttttace gelegttcaa ttettatta ttetttttg 360
 clllleclllg aalcalccc gaclaacal llececala ceclalalal clleglaac 420
 ettacaate cgaagacege gtgcacaaa atcaacttet tgcagecet catttettat 480
 ataggtagec atcaetttt tgttttttce gtgctatat atgtatatat gtettettte 540
 lleclgelaa gggacccaac aclaellll lgelglalal acclaelcac accglaccl 600
 aaaatecaaa gceettteca ctgtacacac tttaetetta ategceetce ataactettg 660
 ctetettggt aaaatcgtag tttgtagtat tttttgste aagggtaceg cccacgaact 720
 alagaagalg aggelllclc aallcllcag aglaalgcaa gccclcalgl llecegelet 780
 calggllcga aaaaaaaga acglgllcll aaactatact gleeeggcaa accltttge 840
 teegstaage ttgtaaaag ceettgtata tgcagegte ttgcagcag aacaaaaaaa 900
 gcaalegaa aggecagcll caaaaalal lggaaclla gaalcaccac clglclclca 960
 agclglaca laclaccact accgelacaa ccagcllla cccgalcal acagclclla 1020
 agacaaataa aatttataga gacttgtta gtatactcc tetetaact aggetcegg 1080
 leclgecagl aalageccac ttagaaaga aaaaaaaa aalcagaaa caagggclla 1140
 alclcagcag aleglacaa caaggelact claelgclla caalacccegg llglacalcl 1200
 aagtegtata caaatgattt atccccagc aaatgacat tgaatttct cagcaagc 1260
 ccaaggecll leegcaaglt gaecglgcl lgeclgela lggllcagcg acccacaag 1320
 gaeccllat leglalccal clalglgllg lggagcaag aalcacegc gllclagcl 1380

ggallct	1387
(210) 5	
(211) 1386	
(212) DNA	
(213) <i>Saccharomyces bayanus</i> Type strain CBS380	
(400) 5	
caactglagt laagelggta agagecagac egaglagtgi aglggglgac calaagegaa 60	
acteaagtgc tgaatcttt atattttttt ttttgetatt cctetatacg tacaattcac 120	
gtataacgta ccattcgatt cagaaaaac ccactatcc agctgcactc ttttctaaa 180	
gagclalga caacacglgc atglullac lgcclgalgi glacclgcll altcllacc 240	
ttctctcgc atattccttc cctccggtt tttttttttt cttgttttcc ttgcacac 300	
acgttttaet ctctgcctt ttctaccgc tegtccaatt ccttattatt ccttttgc 360	
llccllga aalacccgc aclaacalll cccgcacac clalalclcl lcglaaccl 420	
lacaacccg aagaccgcl cagaaaaal caactcltc galegcctca lllcllalat 480	
agtagccat caetctttg tttttccgt gctatatat gtatatatgt cttctttct 540	
cclgelaaga gacccaacac laclllllg clglalalac clactcacac cglacclaa 600	
aalcaaaag clcllccact glacacactl laclcllaal cgccllccal aacclclgl 660	
ctcttggtaa aatcgtagt ttagtattt ttttggtcaa ggtacgcgc caggaactat 720	
agaagalgag gcllclcaa lcllccagag laalgcaag cclcatgtll cccgcclca 780	
lglclcgaaa aaaaagaac lglclcllaa aclalacclg cgggcaaac lcllccgc 840	
cggtaagct ttgtaaaag cctgtatat cagcgcgtt ttgcacaga aacaaaaag 900	
caaalcgaaa ggcagcltc aaaaalaatl ggaacclag calcaccac lgtclclca 960	
gelglacal aclaccaccl cgcclacaac ccagclllac cggalcala cagclclla 1020	
gacaaataa atttatagag acttggtcag tcatactct ctctaaacta gctccgct 1080	
cctccagta atagccact tagaaagaa taaaaacaa atcagacac aaggsetta 1140	
lclcagcaga tclgaacaac aagclactc laclgcltac aalacccclg lglacalca 1200	
agclglalac aalgaatlal lcccaagca aalgcacatl gcaatlccgc agcaagcac 1260	
caagccclll cgcacaaglg caaccllgl agclgclat gcllccagca cgcacaagg 1320	
acgccttatt cgtatccat tatgttgtt gtagcaaga aatcccgcc ttctagcat 1380	
gallct	1386
(210) 6	
(211) 30	
(212) DNA	
(213) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> X2180-1A	
(400) 6	
tatatctatt ataataacg atgagatga	30
(210) 7	
(211) 30	
(212) DNA	
(213) <i>Saccharomyces bayanus</i> Type strain CBS380	
(400) 7	
(401)	
gclagtggla glatglaaca gcllgagaga	30
(210) 8	
(211) 19	
(212) DNA	
(213) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> X2180-1A	
(400) 8	

caccgttcc cgtccgat.

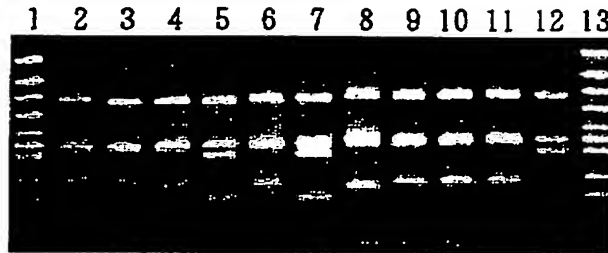
19

【図面の簡単な説明】

【図2】実施例4における電気泳動図。

【図1】実施例1における電気泳動図。

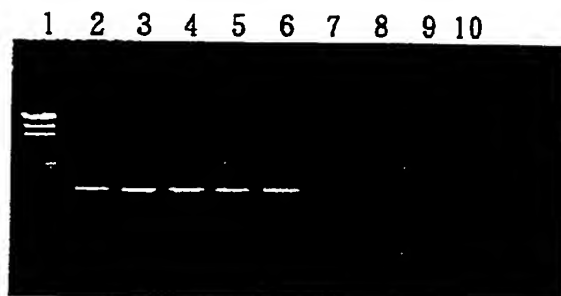
【図1】

A. Msp Iにより切断B. ScrFIにより切断

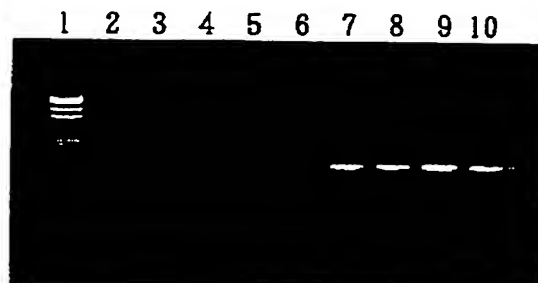
- レーン 1 : マーカー ϕ X174-HincII
 レーン 2 : サッカロマイセス・セレビシエ X2180-1A
 レーン 3 : 下面発酵ビール酵母BF1
 レーン 4 : 下面発酵ビール酵母BF2
 レーン 5 : 下面発酵ビール酵母CBS1513
 レーン 6 : 下面発酵ビール酵母IFO2003
 レーン 7 : サッカロマイセス・パストリアヌス
 タイプ・ストレインCBS1538
 レーン 8 : 下面発酵ビール酵母ATCC10596
 レーン 9 : 下面発酵ビール酵母NCYC529
 レーン10 : 下面発酵ビール酵母NCYC1047
 レーン11 : 下面発酵ビール酵母IFO10012
 レーン12 : サッカロマイセス・バヤナス CBS380
 レーン13 : マーカー ϕ X174-HincII

【図2】

A. プライマー①及び③を用いた PCR



B. プライマー②及び③を用いた PCR



- レーン 1 : マーカ λ -HindIII
レーン 2 : サッカロマイセス・セレビシエ X2180-1A
レーン 3 : 上面発酵ビール酵母TF1
レーン 4 : 下面発酵ビール酵母BF1
レーン 5 : 下面発酵ビール酵母BF2
レーン 6 : 下面発酵ビール酵母IFO2003
レーン 7 : 下面発酵ビール酵母CBS1513
レーン 8 : サッカロマイセス・バヤナス CBS380
レーン 9 : サッカロマイセス・パストリアヌス
タイプ・ストレインCBS1538
レーン10 : サッカロマイセス・モナセンシス CBS 1503

フロントページの続き

(51)Int.Cl.7

識別記号

F1

テ-71-ド(参考)

C12R 1:85)

Fターム(参考) 4B024 AA11 AA20 BA80 CA09 CA11
DA06 EA04 FA18 GA30 HA12
4B063 QA13 QA18 QQ07 QQ54 QR35
QR40 QR55 QR62 QR76 QS25
QS34